

Resumen #894

Tratamiento combinado "in vitro" de Anfotericina-B y Clomipramina sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*

<sup>1</sup>Amelia E, <sup>1</sup>Juarez M, <sup>1</sup>Vejares M, <sup>2</sup>Konigheim B, <sup>2</sup>Aguilar J, <sup>3</sup>Juarez V, <sup>4</sup>Strauss M, <sup>1</sup>Rivarola W

<sup>1</sup>Cátedra de Física Biomédica. Centro de Estudios e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. FCM. UNC; <sup>2</sup>Instituto de Virología Dr J M Vanella. FCM. UNC; <sup>3</sup>Centro de Microscopía Electrónica (CME), FCM, UNC. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), CONICET;

<sup>4</sup>Cátedra de Física Biomédica. Centro de Estudios e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. FCM. UNC e INICSA/CONICET

**Persona que presenta:**

Juarez M, marcosdanieljuarez1@gmail.com

**Área:**

Básica

**Resumen:**

La leishmaniasis, una enfermedad infecciosa causada por protozoarios del género *Leishmania*, es un problema de salud pública alrededor del mundo. Anfotericina-B, fármaco utilizado en el tratamiento, es a menudo tóxico para los pacientes. La búsqueda de nuevos fármacos debe identificar blancos moleculares en el parásito y ausentes en el huésped. La tripanotona reductasa es una enzima exclusiva del orden Kinetoplastida, por lo que le confiere utilidad como blanco molecular. Antidepresivos tricíclicos, como clomipramina (CLO) son buenos inhibidores de esta enzima. El objetivo del presente trabajo fue analizar el tratamiento combinado "in vitro" de Anfotericina-B (ANF) y CLO sobre promastigotes de *L. braziliensis*.

Realizamos un ensayo de citotoxicidad (MTT) sobre células Vero, incubando  $2,5 \times 10^5$  cel/mL con ANF=25-400 µg/mL y CLO=25-1000 µg/mL y un ensayo de efecto combinado (checkerboard) en el que se incubaron  $3 \times 10^6$  promastigotes/mL con ANF=0,002-0,032 µg/mL y CLO=0,3-2 µg/mL. Determinamos los valores de la concentración inhibitoria del 50% (IC50) de ambas drogas y evaluamos el efecto de la combinación con el Índice de Combinación (CI: CI>1 antagónico; CI=1 aditivo; CI<1 sinérgico) y graficamos isobologramas a partir de los valores de IC50 de cada una de las drogas y de las combinaciones. Las alteraciones ultraestructurales de las leishmanias se evaluaron con microscopía electrónica.

El IC50 de ANF fue de 0,018 µg/ml y de CLO 1,098 µg/ml sobre promastigotes, siendo 25 y 108 veces menor que la concentración citotóxica. Los valores de IC50 sobre la línea celular Vero fueron 0,44 µg/ml para ANF y 119 µg/ml para CLO. El valor del CI de 0,18 indica efecto sinérgico. Los isobologramas muestran que los IC50 de las combinaciones se ubicaron por debajo de la línea de aditividad, lo que indica un efecto sinérgico entre ANF y CLO, coincidiendo con el resultado obtenido con el índice de combinación. Estos resultados coinciden con lo observado en las microfotografías, ya que las mayores alteraciones corresponden a las leishmanias tratadas con la combinación.

El efecto sinérgico observado puede ser resultado de los mecanismos de acción complementarios de ambas drogas, que estarían potenciando el efecto letal, produciendo la muerte del parásito a menores concentraciones que la monoterapia y sin efectos tóxicos evidentes sobre el huésped.

**Palabras Clave:**

Leishmaniasis, anfotericina-B, clomipramina, tripanotona reductasa

Combined "in vitro" treatment of Amphotericin-B and Clomipramine on promastigotes of *Leishmania braziliensis*

<sup>1</sup>Amelia E, <sup>1</sup>Juarez M, <sup>1</sup>Vejares M, <sup>2</sup>Konigheim B, <sup>2</sup>Aguilar J, <sup>3</sup>Juarez V, <sup>4</sup>Strauss M, <sup>1</sup>Rivarola W

<sup>1</sup>Cátedra de Física Biomédica. Centro de Estudios e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. FCM. UNC; <sup>2</sup>Instituto de Virología Dr J M Vanella. FCM. UNC; <sup>3</sup>Centro de Microscopía Electrónica (CME), FCM, UNC. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), CONICET;

<sup>4</sup>Cátedra de Física Biomédica. Centro de Estudios e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. FCM. UNC e INICSA/CONICET

**Persona que presenta:**

Juarez M, marcosdanieljuarez1@gmail.com

**Abstract:**

Leishmaniasis, an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, is a public health problem around the world. Amphotericin-B, a drug used for its treatment, is often toxic to patients. The search for new drugs should identify molecular targets in the parasite and absent in the host. Trypanothione reductase is an exclusive enzyme of the order Kinetoplastida, which makes it useful as a molecular target. Tricyclic antidepressants, such as clomipramine (CLO) are good inhibitors of this enzyme. The objective of this work was to analyze the combined "in vitro" treatment of Amphotericin-B (ANF) and CLO on promastigotes of *L. braziliensis*.

We performed a cytotoxicity (MTT) test on Vero cells, incubating  $2.5 \times 10^5$  cells/ml with ANF = 25-400 µg/ml and CLO = 25-1000 µg/ml and a combined effect test (checkerboard) in which  $3 \times 10^6$  promastigotes/ml were incubated with ANF = 0.002-0.032 µg/ml and CLO = 0.3-2 µg/ml. We determined the values of the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of both drugs, evaluated the effect of the combination calculating the Combination Index (CI: CI > 1 antagonistic; CI = 1 additive; CI < 1 synergic) and plotted isobolograms from the IC<sub>50</sub> values of each of the drugs and the combinations. The ultrastructural alterations in the leishmanias were evaluated with electron microscopy.

IC<sub>50</sub> values upon promastigotes were 0.018 µg/ml for ANF and 1.098 µg/ml for CLO, being 25 and 108 times lower than the cytotoxic concentration, respectively. IC<sub>50</sub> values upon Vero cells were 0.44 µg/ml for ANF and 119 µg/ml for CLO. The CI value of 0.18 indicates a synergistic effect. The IC<sub>50</sub> of the combinations were located below the line of additivity in the isobolograms, which indicates a synergistic effect between ANF and CLO, coinciding with the result obtained with the CI. These results coincide with those observed in the microphotographs, since the greatest alterations corresponded to the leishmanias treated with the combination.

The observed synergistic effect may be the result of the complementary mechanisms of action of both drugs, which would potentiate the lethal effect, causing the death of the parasite at lower concentrations than the monotherapy and without obvious toxic effects to the host.

**Keywords:**

Leishmaniasis, Amphotericin-B, clomipramine, trypanothione reductase